

TESIS

**ANALISIS EFEKTIVITAS CRUDE PROTEIN *Zoothamnium penaei*
SEBAGAI BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN TERHADAP
RESPON IMUN DAN KELULUSHIDUPAN UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*) YANG DIINFEKSI *White Spot Syndrome Virus***



Oleh

PutuAnggaWiradana

NIM 091724153001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

**ANALISIS EFEKTIVITAS CRUDE PROTEIN *Zoothamnium penaei*
SEBAGAI BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN TERHADAP
RESPON IMUN DAN KELULUSHIDUPAN UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*) YANG DIINFEKSI *White Spot Syndrome Virus***

Oleh

PutuAnggaWiradana

NIM 091724153001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

ANALISIS EFEKTIVITAS CRUDE PROTEIN *Zoothamnium penaei* SEBAGAI BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN TERHADAP RESPON IMUN DAN KELULUSHIDUPAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG DIINFEKSI *White Spot Syndrome Virus*

Untuk Memenuhi Syarat Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan
Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga

Oleh

Putu Angga Wiradana

NIM 091724153001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

Tesis

ANALISIS EFEKTIVITAS CRUDE PROTEIN *Zoothamniumpenaei* SEBAGAI
BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN TERHADAP RESPON
IMUN DAN KELULUSHIDUPAN UDANG VANAME (*Litopenaeusvannamei*)
YANG DIINFEKSI *White Spot Syndrome Virus*

Tesis Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister Sains Pada
Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan
Kelautan Universitas Airlangga

Oleh :

Putu Angga Wiradana
091724153001

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Ketua

Pembimbing Serta



Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si
NIP. 196009121986032001



Dr. Eduardus Bimo Aksono H, drh., M.Si
NIP. 196609201992031003

Tesis

ANALISIS EFEKTIVITAS CRUDE PROTEIN *Zoothamnium penaei* SEBAGAI
BAHAN PENGEMBANGAN IMUNOSTIMULAN TERHADAP RESPON
IMUN DAN KELULUSHIDUPAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)
YANG DIINFEKSI *White Spot Syndrome Virus*

Oleh :
Putu Angga Wiradana
091724153001

Telah diujikan pada
Tanggal :30 Januari 2020

KOMISI PENGUJI TESIS

Pembimbing Ketua : Dr. GunantiMahasri, Ir., M.Si
Pembimbing Serta : Dr. Eduardus Bimo Aksono Herupradoto, drh.,M.Si
Anggota I : Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, MS., Drh
Anggota II : Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP
Anggota III : Dr. Laksmi Sulmartiwi, S.Pi., MP

Surabaya, 31 Januari 2020
Fakultas Perikanan dan Kelautan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Dr. Mirni Lamid, MP.,drh
NIP.196201161992032001

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N a m a : Putu Angga Wiradana
N I M : 091724153001
Prodi : Magister (S2) Bioteknologi Perikanan dan Kelautan
Tempat, tanggal lahir : Denpasar, 28 Februari 1995
Alamat : Jl. Mojo III No.20A, Gubeng, Surabaya, Jawa Timur
Telp./HP 081230662336
Judul Tesis : Analisis Efektivitas Crude Protein *Zoothamnium penaei* Sebagai Bahan Pengembangan Imunostimulan Terhadap Respon Imun dan Kelulushidupan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Diinfeksi *White Spot Syndrome Virus*.
Pembimbing : 1. Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si
2. Dr. Eduardus Bimo Aksono Herupradoto, drh., M.Si

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang berjudul diatas, bagian atau keseluruhan tesis ini tidak pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademis pada' bidang studi dan/ atau Universitas lain dan tidak pernah dipublikasi atau ditulis oleh individu selain penyusun kecuali bila dituliskan dengan format kutipan dalam isi penulisan tesis.

Apabila ditemukan bukti bahwa pernyataan saya tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan yang berlaku di Universitas Airlangga. Demikian surat pernyataan yang saya buat tanpa ada unsur paksaan dari siapapun dan dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 31 Januari 2020
Yang membuat pernyataan,



Putu Angga Wiradana
091724153001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puja dan Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Ida Sang Hyang Widhi Wasa/ Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia dan berkah Beliau sehingga Tesis ini telah berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian Tesis ini adalah pengembangan imunostimulan dalam budidaya udang, dengan judul “Analisis Efektivitas Crude Protein *Zoothamnium penaei* Sebagai Bahan Pengembangan Imunostimulan Terhadap Respon Imun dan Kelulushidupan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Diinfeksi *White Spot Syndrome Virus*”.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si selaku pembimbing utama tesis yang telah banyak memberikan dorongan, arahan dan bimbingan sejak awal perkuliahan, penyusunan penelitian pendahuluan hingga terselesaikannya penelitian Tesis ini. Di saat semangat ini mulai memudar beliau selalu memberikan dorongan dan motivasi agar selalu berjuang dan disiplin dalam menyelesaikan pekerjaan dalam studi magister ini. Bahkan selama masa perkuliahan di program magister beliau selalu memberikan kesabaran dalam mengajar dan membimbing.
2. Dr. Eduardus Bimo Aksono Herupradoto, drh., M.Si., selaku pembimbing serta Sekretaris Pusat Inovasi Pembelajaran dan Sertifikasi (PIPS) Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan arahan, motivasi

hingga waktu luang hingga penulis dapat menyelesaikan Tesis ini. Dari beliau penulis banyak belajar tentang sikap disiplin dan optimis dalam menggapai cita-cita.

3. Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, MS., Drh., selaku Ketua Penguji Tesis dan Ketua Program Studi Magister Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga yang banyak memberikan wawasan keilmuan, motivasi dalam belajar dan kedisiplinan selama penulis mengikuti perkuliahan dan penyusunan tesis ini. Dari beliau penulis banyak belajar tentang sikap pantang menyerah selagi berhadapan dengan masalah.
4. Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP., selaku anggota penguji Tesis yang banyak memberikan semangat, bimbingan dan wawasan keilmuan yang sangat menunjang akademik penulis selama mengikuti program magister hingga penulisan tesis ini. Dari beliau penulis belajar tentang semangat pantang menyerah serta memperoleh ilmu terutama Dasar-dasar Imunologi.
5. Dr. Laksmi Sulmartiwi, S.Pi., MP., selaku anggota penguji Tesis yang telah banyak memberikan arahan dan masukan dalam penulisan tesis ini. Dari beliau penulis tentang semangat dan banyak memperoleh ilmu terutama mengenai Fisiologi Hewan Akuatik.
6. Prof. Dr. Hari Suprpto, Ir., M.Agr., selaku dosen wali penulis di program magister yang telah banyak memberikan semangat juang untuk terus

belajar dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Dari beliau penulis belajar kedisiplinan dan semangat pantang menyerah dalam menggapai cita-cita.

7. Prof. Dr. Mirni Lamid., MP., drh., selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga beserta para staf yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk dapat mengikuti pendidikan program magister.
8. Bapak Sugeng Raharjo, A.Pi selaku Kepala Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau, Jepara, Jawa Tengah yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk melaksanakan penelitian di BBPBAP Jepara.
9. Ibu Retno Handayani, M.Si selaku Kepala Laboratorium Manajemen Kesehatan Hewan Akuatik, BBPBAP Jepara beserta staf Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Genetika dan Histologi yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian serta banyak belajar mengenai sopan santun, tata karma dan semangat kedisiplinan.
10. Bapak Supardiman, A.Md selaku koordinator tambak udang BBPBAP jepara yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian dan memberikan semangat moril. Dari beliau penulis belajar banyak mengenai kedisiplinan dan manajemen budidaya udang vaname.
11. Bapak Drs. Ida Bagus Made Suaskara, M.Si selaku Dosen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bali yang telah memberikan rekomendasi, dorongan dan semangat untuk terus belajar hingga penulis dapat melanjutkan di program magister.

12. Teman-teman seperjuangan di Program Magister Bioteknologi Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Kelautan, Univeristas Airlangga, atas pengertian, kerjasama, dorongan semangat dan bantuan secara moril yang diberikan kepada penulis sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.
13. Kedua orang tua saya serta kakek dan nenek yang telah banyak menginspirasi, memberikan dorongan semangat, dukungan moril, materi dan kesabaran untuk terus mendukung saya untuk dapat menyelesaikan program Magister di Univesitas Airlangga. Semoga kelak, Ida Sang Hyang Widhi Wasa membalas jasa dan pahala kalian semua.
14. Tunangan penulis Kadek Desy Kartika, S.Si., M.Si yang penuh kesabaran memberikan semangat dan dukungan moril hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tesis ini.
15. Kedua saudara saya, Made Bramastha Arya Wirakusuma dan Nyoman Dion Arya Wirakarna beserta seluruh keluarga besar yang telah banyak memberikan semangat selama penulis menempuh program Magister yang tidak mungkin bisa penulis sebut satu persatu, penulis sampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya, semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa selalu melimpahkan keRahayuan. Om Swaha.

Surabaya, 31 Januari 2020

Penulis

Putu Angga Wiradana

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
SAMPUL DALAM.....	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iv
KOMISI PENGUJI TESIS.....	v
SURAT BEBAS PLAGIARISME.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR ISTILAH.....	xvii
RINGKASAN.....	xviii
SUMMARY.....	xxi
ABSTRAK.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Udang Vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	9
2.1.1. Klasifikasi, Morfologi dan Distribusi.....	10
2.1.2. Habitat dan Siklus Hidup Udang Vaname.....	13
2.1.3. Kebutuhan Kualitas Air Udang Vaname.....	14
2.2. <i>White Spot Syndrome Virus</i> (WSSV).....	17
2.2.1. Morfologi WSSV.....	18
2.2.2. Morfogenesis dan Patogenesis WSSV.....	21
2.2.3. Distribusi, Jalur Penularan dan Gejala Klinis.....	26
2.3. Sistem Pertahanan Tubuh dan Peranan Immunostimulan Pada Udang Vaname.....	28
2.3.1. Sistem Pertahanan Tubuh Udang Vaname.....	28
2.3.1.1. Gambaran Darah Udang (<i>Haemocyte</i>).....	31
2.3.1.2. Aktivitas Enzim <i>Phenoloksidase</i> (PO).....	33
2.3.1.2. Produksi Enzim Antioksidan atau <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS).....	35
2.3.1.4. Aktivitas Fagositosis, Enkapsulasi dan Nodulasi.....	36
2.3.2. Peranan Immunostimulan pada Udang.....	37
2.3.3. Tinjauan tentang <i>Zoothamnium penaei</i>	39
2.3.4. Tinjauan tentang Protein Membran Immunogenik.....	40

III. KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Kerangka konseptual.....	45
-------------------------------	----

3.2. Hipotesis Penelitian.....	47
IV. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian.....	49
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian.....	49
4.3. Populasi dan Sampel.....	49
4.4. Variabel Penelitian.....	50
4.5. Materi Penelitian.....	51
4.6. Definisi Operasional.....	52
4.7. Metode Penelitian.....	55
4.7.1. Pembuatan Inokulum dan Revirulensi Virus untuk Keperluan Uji Tantang.....	55
4.7.2. Perlakuan Imunostimulan Crude Protein <i>Zoothamnium penaei</i> dan Uji Tantang dengan WSSV.....	56
4.8. Uji Hematologi.....	59
4.8.1. Penentuan <i>Total Haemocyte Counts</i> (THC).....	59
4.8.2. Penentuan <i>Differential Haemocyte Counts</i> (DHC).....	59
4.8.3. Aktivitas Enzim <i>Phenoloksidase</i> (PO).....	60
4.9. Uji Ketahanan Udang Vaname terhadap WSSV.....	61
4.9.1. Penentuan Kelulushidupan.....	61
4.9.2. Deteksi Jumlah Copy Virus.....	61
4.10. Pengumpulan dan Analisis Data.....	62
V. ANALISIS HASIL PENELITIAN	

5.1. Nilai <i>Total Haemocyte Counts</i> (THC).....	65
5.2. Nilai <i>Differential Haemocyte Counts</i> (DHC).....	67
5.2.1. Nilai Granular Haemocyte.....	67
5.2.2. Nilai Hyaline Haemocyte.....	68
5.3. Nilai Aktivitas Enzim Phenoloksidase (PO).....	69
5.4. Tingkat Kelulushidupan.....	71
5.5. Hasil Konfirmatif WSSV.....	71
5.6. Gejala Klinis.....	72
VI. PEMBAHASAN.....	75
VII. PENUTUP.....	88
7.1. Kesimpulan.....	88
7.2. Saran.....	89

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Perlakuan pemberian imunostimulan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i>	58
Tabel. 5.1. Hasil uji kemampuan proteksi imunostimulan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i> terhadap nilai <i>Total haemocyte Counts</i> (THC) Udang Vaname yang Diinfeksi WSSV.....	66
Tabel. 5.2. Hasil uji kemampuan proteksi imunostimulan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i> terhadap persentase <i>Differential Haemocyte Counts</i> (DHC) <i>Granular</i> Udang Vaname yang Diinfeksi WSSV.....	67
Tabel. 5.3. Hasil uji kemampuan proteksi imunostimulan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i> terhadap persentase <i>Differential Haemocyte Counts</i> (DHC) <i>Hyalin</i> Udang Vaname yang Diinfeksi WSSV.....	68
Tabel. 5.4. Hasil uji kemampuan proteksi imunostimulan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i> terhadap aktivitas enzim <i>Phenoloksidase</i> Udang Vaname yang Diinfeksi WSSV.....	70
Tabel. 5.5. Nilai copy virus pada udang vaname yang diinfeksi dengan WSSV diberikan crude protein <i>Zoothamnium penaei</i> dan diinfeksi oleh WSSV pada hari ke – 7.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi eksternal dari <i>L. vannamei</i>	10
Gambar 2.2. Habitat dan siklus hidup udang vaname.....	14
Gambar 2.3. Morfologi WSSV.....	19
Gambar 2.4. Skema Morfogenesis WSSV.....	21
Gambar 2.5. Representatif proses infeksi dari WSSV	25
Gambar 2.6. Gejala klinis udang vaname yang terinfeksi WSSV.....	28
Gambar 2.7. Model Skematis Pertahanan Tubuh Udang	30
Gambar 2.8. Klasifikasi dari <i>haemocytes</i>	32
Gambar 2.9. Struktur tiga dimensi proPO β <i>M. japonicas</i>	34
Gambar 2.10. Proses pertahanan sel <i>haemocyte</i> pada udang	37
Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	44
Gambar 4.1. Diagram alir percobaan (<i>Immersion Trials</i>).....	58
Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian.....	64
Gambar 5.5. Tingkat Kelulushidupan udang vaname.....	72
Gambar 5.6. Perubahan gejala klinis secara morfologi pada udang vaname pasca ujiantang WSSV.....	73
Gambar 5.7. Perubahan gejala klinis yang diamati secara mikroskopis pada karapas udang vaname pasca ujiantang WSSV hari ke-7.....	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Reagen untuk PCR dan Prosedur Uji Konfirmatif dengan PCR Konvensional.....	109 111
Lampiran 2. Reagen untuk <i>Real-Time</i> PCR dan Kondisi PCR	112
Lampiran 3. Hasil pemeriksaan parameter kualitas air.....	113
Lampiran 4. Hasil Uji Statistik.....	113

DAFTAR ISTILAH

μL	: mikroliter
βGs	: β-glucans
AMPs	: Antimicrobial peptides
bp	: base pairs
cDNA	: Complementary DNA
CTLs	: C-Type Lectins
DHC	: Differential Haemocyte Counts
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DO	: Dissolved Oxygen
FAO	: Food and Agriculture Organization
HO-1	: Heme oxygenase-1
kDa	: Kilo Dalton
L-DOPA	: L-dihydrophenylalanine
LPS	: Lipopolysaccharides
mL	: milliliter
mRNA	: messenger RNA
nm	: nanometer
OD	: Optical Density
OIE	: Office International des Epizooties
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PG	: Peptidoglycan
PO	: Phenoloxydase
ppm	: part per million
ppt	: part per thousand
proPO	: Prophenoloxydase

qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	: <i>round per minute</i>
SPF	: <i>Specific Pathogen Free</i>
SR	: <i>Survival Rate</i>
TEM	: <i>Transmission Electron Microscope</i>
THC	: <i>Total Haemocyte Counts</i>
U	: <i>Unit</i>
VP	: <i>Virion Protein</i>
WSBV	: <i>White Spot Baculovirus</i>
WSSV	: <i>White Spot Syndrome Virus</i>

RINGKASAN

Putu Angga Wiradana. 2020. Analisis Efektivitas Crude Protein *Zoothamnium penaei* Sebagai Bahan Pengembangan Imunostimulan Terhadap Respon Imun dan Kelulushidupan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Diinfeksi *White Spot Syndrome Virus*. Tesis ini di bawah bimbingan: Dr. Gunanti Mahasri, Ir., M.Si dan Dr. Eduardus Bimo Aksono Herupradoto, drh., M.Si, Program Studi Magister Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor hasil perikanan terbesar di dunia yang hingga saat ini terus berupaya meningkatkan produksi budidaya. Industrialisasi usaha budidaya udang vaname dengan sistem *intensive* menjadi salah satu program pemerintah Indonesia dalam meningkatkan produktivitas perikanan nasional. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas utama dalam program industrialisasi perikanan budidaya tersebut. Namun, upaya ini masih terkendala karena adanya serangan penyakit dalam sistem budidaya udang vaname. Penyakit *white spot syndrome virus* (WSSV) merupakan salah satu penyakit yang harus diberikan perhatian dan bahkan penyakit ini sudah masuk dalam daftar penyakit virus pada udang oleh organisasi kesehatan hewan dunia (OIE). Penyakit WSSV mendapatkan perhatian yang lebih karena mampu menyebabkan kematian massal pada udang vaname dengan kurun waktu 3-7 hari.

Hingga saat ini, kejadian infeksi virus di tambak budidaya baik tradisional hingga *intensive* masih sering dijumpai di seluruh Indonesia. Selain itu, sistem pertahanan tubuh udang vaname yang masih primitif menyebabkan kerentanan terhadap infeksi WSSV. Oleh karena itu, pencegahan penyakit virus dengan menggunakan imunostimulan merupakan salah satu alternatif terbaik pada udang vaname. Salah satu bahan imunostimulan yang ditawarkan sebagai solusi oleh Mahasri (2018) adalah imunostimulan dari crude protein *Zoothamnium penaei* yang dilaporkan mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname sebesar 94% pada sistem budidaya tambak udang tradisional. Imunostimulan ini mulanya dikembangkan sebagai bahan pengendalian terhadap infeksi *Zoothamnium penaei* pada udang windu (*Penaeus monodon*) yaitu ektoparasit penyebab *Zoothamniosis*. Hasil penelitian tersebut melaporkan bahwa penggunaan protein membran imunogenik *Zoothamnium penaei* yang memiliki sifat imunogenik dengan berat molekul protein sebesar 38 kDa, 48 kDa dan 67 kDa mampu meningkatkan respon imunitas (*THC* dan *DHC*) dari udang windu.

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk menganalisis respon imun dan kelulushidupan udang vaname akibat pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* yang diinfeksi oleh WSSV sehingga potensial dikembangkan sebagai imunostimulan pada udang vaname. Sedangkan tujuan khusus adalah 1) Untuk menganalisis pengaruh pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* terhadap peningkatan *THC*, *DHC* dan enzim *phenoloksidase* udang vaname yang diinfeksi oleh WSSV; 2) Untuk menganalisis pengaruh waktu pemeliharaan terhadap

peningkatan THC, DHC dan enzim *phenoloksidase* pada udang vaname yang diinfeksi oleh WSSV; 3) Untuk menganalisis interaksi pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* dan waktu pemeliharaan terhadap peningkatan THC, DHC, enzim *phenoloksidase* udang vaname yang diinfeksi oleh WSSV; dan 4) Untuk mengetahui pengaruh pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* dalam meningkatkan kelulushidupan dan ketahanan udang vaname yang diinfeksi oleh WSSV.

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan antara lain: 1) Preparasi jaringan udang vaname positif WSSV yang akan digunakan sebagai bahan revirulensi/perbanyak virus dan ujiantang; 2) Skrining hewan uji yaitu udang vaname yang bersifat *specific pathogen free* dengan menggunakan PCR; 3) Aklimatisasi hewan uji selama 1 minggu; 4) Perlakuan imunostimulan crude protein *Zoothamnium penaei*, ujiantang dan masa pemeliharaan. Perlakuan yang digunakan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu P1 : Pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* dosis 3 ppm + infeksi WSSV dosis 10^{-3} dan P2: tanpa pemberian crude protein *Zoothamnium penaei*+infeksi WSSV dosis 10^{-3} ; 5) Analisis parameter hematologi (THC, DHC dan enzim *phenoloksidase*) dan uji ketahanan udang vaname meliputi penentuan kelulushidupan dan deteksi jumlah copy virus dengan *real time-PCR*. Data yang telah terkumpul, lalu dilakukan analisis statistik. Data kualitatif yang meliputi hasil PCR, kualitas air dan gejala klinis ditampilkan melalui gambar. Sedangkan untuk data kuantitatif yang meliputi THC, DHC, Enim *phenoloksidase* dan kelulushidupan udang vaname di analisis menggunakan *software* SPSS 20 dengan *Two Way ANOVA* dan bila terdapat perbedaan secara nyata dilakukan uji DUNCAN pada taraf nyata 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah THC pada hari ke-0 untuk perlakuan P1 adalah sebesar $2,43^b \pm 1,4659$ sel/mL lebih tinggi namun tidak signifikan dengan perlakuan P2 yaitu sebesar $1,44^{ab} \pm 1,9077$ sel/mL. Nilai THC tersebut cenderung mengalami peningkatan pada perlakuan P1 pasca perendaman dengan imunostimulan crude protein *Zoothamnium penaei* pada hari ke-0. Sebaliknya, nilai THC pada hari ke-4 mengalami penurunan pada kedua perlakuan pasca ujiantang dengan WSSV yaitu masing-masing sebesar $1,77^{ab} \pm 1,0040$ sel/mL dan $0,45^a \pm 0,097$ sel/mL. Namun, penurunan yang terjadi pada P2 lebih tinggi namun tidak signifikan. Pada akhir pengamatan yaitu hari ke-7, nilai THC pada perlakuan P1 justru mengalami peningkatan yang signifikan yaitu sebesar $2,25^b \pm 0,3786$ sel/mL pasca pemberian *booster* pada hari ke-4, sedangkan nilai THC pada P2 terus mengalami penurunan secara nyata jika dibandingkan dengan P1 pada akhir pengamatan yaitu sebesar $0,44^a \pm 0,0464$ sel/mL. Terdapat pengaruh antara pemberian crude protein *Zoothamnium penaei* dosis 3 ppm terhadap peningkatan *Total Haemocyte Counts* (THC) pada udang vaname yang diinfeksi dengan WSSV.

Persentase granular haemocyte pada penelitian ini menunjukkan terjadinya peningkatan pada perlakuan P1 pada hari ke-0 pasca diimunisasi dengan crude protein *Zoothamnium penaei* dosis 3 ppm yaitu sebesar $61,75^b \pm 14,975\%$, berbeda secara nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan persentase P2 yaitu

sebesar $43,00^a \pm 3,830\%$. Penurunan persentase granular haemocyte di hari ke-4 pada kedua perlakuan pasca diuji tantang dengan WSSV yaitu persentase masing-masing sebesar $45,25^a \pm 2,363\%$ dan $35,75^a \pm 7,136\%$, namun penurunan yang terjadi berbeda nyata dengan perlakuan P1 pada hari ke-0. Peningkatan persentase granular haemocyte justru terjadi secara signifikan pada pengamatan hari ke-7 terutama pada perlakuan P1 yaitu sebesar $71,00^a \pm 5,228\%$, berbeda secara nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan perlakuan P2 yang terus mengalami penurunan sebesar $32,75^a \pm 9,845\%$. Persentase hyaline haemocyte juga menunjukkan terjadinya peningkatan pada perlakuan P1 pada hari ke-0 pasca diimunisasi dengan crude protein *Zoothamnium penaei* yaitu sebesar $49,25^b \pm 7,455\%$ tidak berbeda nyata dengan persentase P2 yaitu sebesar $47,75^b \pm 10,145^b\%$. Berbeda dengan persentase granular haemocyte pada hari ke-4, justru terjadi peningkatan persentase namun tidak signifikan pada perlakuan P1 pasca diuji tantang dengan WSSV yaitu sebesar $54,75^{bc} \pm 2,363\%$, Persentase hyaline haemocyte pada P2 masih tetap sebesar $47,25^b \pm 6,397\%$ dan tidak berbeda secara nyata dengan hari ke-0. Sama halnya dengan persentase granular haemocyte, persentase P1 pada hari pengamatan ke-7 menunjukkan peningkatan namun tidak signifikan dengan hari ke-4 yaitu sebesar $61,75^c \pm 3,775\%$ dan berbeda secara nyata dengan perlakuan P2 yang terus mengalami penurunan sebesar $35,75^a \pm 4,193\%$, lebih rendah jika dibandingkan dengan hari ke-4.

Aktivitas enzim *Phenoloksidase* (PO) udang vaname setelah imunisasi dengan crude protein *Zoothamnium penaei* dapat terlihat bahwa pada hari ke – 0 terjadi peningkatan pada perlakuan P1 yaitu sebesar $0,3145^b \pm 0,0411$ U/min/mg, lebih tinggi namun tidak signifikan jika dibandingkan dengan P2 yang hanya sebesar $0,2787^{ab} \pm 0,0121$ U/min/mg. Setelah dilakukan uji tantang dengan WSSV terjadi penurunan namun tidak signifikan dibandingkan dengan hari ke-0 pada kedua perlakuan dengan masing – masing sebesar $0,2675^{ab} \pm 0,05173$ U/min/mg dan $0,2437^a \pm 0,03027$ U/min/mg. Pada akhir pengamatan, nilai PO pada perlakuan P1 tidak berbeda secara nyata dengan hari ke-4 yaitu sebesar $0,2772^{ab} \pm 0,04491$ U/min/mg, namun memiliki perbedaan namun tidak signifikan dengan P2 yaitu sebesar $0,2527^a \pm 0,01472$ U/min/mg.

Kelulushidupan pada udang vaname menunjukkan adanya perbedaan antar kedua perlakuan. Kelulushidupan udang vaname yang diimunisasi dengan crude protein *Zoothamnium penaei* dan diinfeksi dengan WSSV (P1) memiliki persentase kelulushidupan tertinggi yaitu sebesar 90%. Persentase kelulushidupan pada perlakuan P2 yang hanya diinfeksi dengan WSSV adalah sebesar 10%. Diperoleh hasil bahwa nilai copy virus pada perlakuan P2 adalah sebesar 100.000 copy, sedangkan pada perlakuan P1 tidak teridentifikasi WSSV pada hari ke tujuh. Secara *subakut* akan memperlihatkan gejala klinis berupa bercak putih (*white spot*) pada bagian karapas dan rostrum. Secara morfologis, tubuh, kaki renang dan ekor udang vaname yang sekarat akan berwarna kemerahan (*discolouration*) hingga kecoklatan.

SUMMARY

Putu Angga Wiradana. 2020. Analysis of Effectiveness of *Zoothamnium penaei* Crude Protein as an Immunostimulant Development Material On the Immune Response and Survival rate of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Against *White Spot Syndrome Virus*. Program Study of Magister Biotechnology of Fisheries and Marine Science, Faculty of Fisheries and Marine Science, Universitas Airlangga, Surabaya.

Indonesia is one of the largest exporter of fishery products in the world, which until now continues to improve aquaculture production. Industrialization of pacific white shrimp farming with the intensive system is one of the Indonesian government's programs in increasing national fisheries productivity. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is one of the main commodities in the aquaculture industrialization program. However, this effort is still constrained due to disease attacks in the shrimp cultivation system. *White spot syndrome virus* (WSSV) is one disease that must be given attention and even this disease has been included in the list of viral diseases in shrimp by the world animal health organization (OIE). WSSV is gaining more attention because it can cause mass death in pacific white shrimp within a period of 3-7 days.

Until now, the incidence of virus infections in traditional and intensive aquaculture ponds is still common throughout Indonesia. In addition, the primitive pacific white shrimp body's defense system causes vulnerability to WSSV infection. Therefore, the prevention of viral diseases using immunostimulants is one of the best alternatives in pacific white shrimp. One of the immunostimulant ingredients offered as a solution by Mahasri (2018) is immunostimulant from *Zoothamnium penaei* crude protein which is reported to be able to increase the survival rate of pacific white shrimp by 94% in traditional shrimp pond culture systems. This immunostimulant was originally developed as a control material against *Zoothamnium penaei* infection in tiger prawn (*Penaeus monodon*), the ectoparasites that cause *Zoothamniosis*. The results of the study reported that the use of *Zoothamnium penaei* immunogenic membrane protein which has immunogenic properties with a protein molecular weight of 38 kDa, 48 kDa, and 67 kDa can increase the immune response (THC and DHC) of tiger prawn.

The general objective of this study was to analyze the immune response and survival of pacific white shrimp due to the administration of *Zoothamnium penaei* crude protein infected by WSSV so that the potential was developed as an immunostimulant in pacific white shrimp. Whereas the specific objectives are 1) To analyze the utilization of *Zoothamnium penaei* crude protein to increase THC, DHC and pacific white shrimp phenoloxidase enzymes infected by WSSV; 2) To analyze the increasing time to increase THC, DHC and phenoloxidase enzymes in pacific white shrimp infected by WSSV; 3) To analyze the interaction of crude protein administration of *Zoothamnium penaei* and time to repair the increase in THC, DHC, pacific white shrimp phenoloxidase enzymes infected by WSSV; and 4) To understand the effect of *Zoothamnium penaei* crude protein in improving survival and increasing pacific white shrimp infected by WSSV.

This study was designed using a laboratory experimental research method with a completely randomized design (CRD) factorial. This research consists of several stages, among others: 1) Preparation of positive WSSV pacific white shrimp tissue which will be used as a material for viral virulence/propagation and challenge testing; 2) Screening of test animals, namely pacific white shrimp which is a *specific free pathogen* using PCR; 3) Acclimatization of test animals for 1 week; 4) *Zoothamnium penaei* crude protein immunostimulant treatment, challenge test and funding period. The treatment used was divided into 2 groups namely P1: Giving *Zoothamnium penaei* crude dose 3 ppm + WSSV infection dose 10^{-3} and P2: without giving *Zoothamnium penaei* crude protein + WSSV infection dose 10^{-3} ; 5) Analysis of hematological parameters (THC, DHC, and phenoloxidase enzymes) and shrimp endurance test according to the requirements and detection of the amount of virus with *real-time* PCR. Data that has been collected then carried out statistical analysis. Published qualitative data on PCR results, water quality, and clinical summary were agreed through the images. While quantitative data containing THC, DHC, *phenoloxidase* enzyme and survival rate of pacific white shrimps were analyzed using SPSS.20 software with Two Way ANOVA and when needed, analysis related to DUNCAN was applied at 5% significance level.

The results showed that the amount of THC on day 0 for P1 treatment was $2.43^b \pm 1.4659$ cells/mL higher but not significant with P2 treatment which was $1.44^{ab} \pm 1.9077$ cells/mL. The THC value tends to increase in the post-immersion P1 treatment with *Zoothamnium penaei* crude protein immunostimulant on day 0. On the other hand, THC values on day 4 decreased in both treatments after the challenge test with WSSV, namely $1.77^{ab} \pm 1.0040$ cells/mL and $0.45^a \pm 0.097$ cells/mL, respectively. However, the decrease that occurred at P2 was higher but not significant. At the end of the observation that is the 7th day, the THC value in the P1 treatment actually experienced a significant increase of $2.25^b \pm 0.3786$ cells/mL after booster administration on the 4th day, while the THC value at P2 continued to decrease significantly if compared with P1 at the end of the observation which is $0.44^a \pm 0.0464$ cells/mL. There is an influence between the administration of crude protein *Zoothamnium penaei* dose of 3 ppm to the increase in *Total Haemocyte Counts* (THC) in pacific white shrimp infected with WSSV.

The percentage of granular hemocyte in this study showed an increase in P1 treatment on day 0 after immunization with *Zoothamnium penaei* crude protein dose of 3 ppm, which was $61.75^b \pm 14.975\%$, significantly different ($p < 0.05$) when compared with the percentage P2 is equal to $43.00^a \pm 3.830\%$. The decrease in the percentage of granular hemocytes on the 4th day of the two post-test treatments was challenged with WSSV, namely the percentage respectively $45.25^a \pm 2.363\%$ and $35.75^a \pm 7.136\%$, but the decrease that occurred was significantly different from the P1 treatment on day-to-day 0. The increase in the percentage of granular hemocytes actually occurred significantly on the 7th-day observation, especially in the P1 treatment that was equal to $71.00^a \pm 5.228\%$, significantly different ($p < 0.05$) when compared to the P2 treatment which continued to decrease by $32.75^a \pm 9,845\%$. The percentage of hyaline hemocyte also showed an

increase in P1 treatment on day 0 after immunization with *Zoothamnium penaei* crude protein which was $49.25^b \pm 7.455\%$, not significantly different from the percentage P2 which was $47.75^b \pm 10.145b\%$. In contrast to the percentage of granular hemocytes on the 4th day, there was an increase in percentage but not significant in the treatment of P1 after being challenged with WSSV which was $54.75^{bc} \pm 2.363\%$, the percentage of hyaline hemocytes on P2 was still $47.25^b \pm 6.397\%$ and not significantly different from day 0. Similar to the percentage of granular hemocytes, the percentage of P1 on the 7th day of observation showed an increase but was not significant with the 4th day of $61.75^c \pm 3.775\%$ and significantly different from the P2 treatment which continued to decrease by $35.75^a \pm 4,193 \%$, lower than the 4th day.

The enzyme *Phenoloxidase* activity of pacific white shrimp after immunization with *Zoothamnium penaei* crude protein can be seen that on day 0 there was an increase in P1 treatment which was $0.3145^b \pm 0.0411$ U/min/mg, higher but not significant if compared to with P2 which is only $0.2787^{ab} \pm 0.0121$ U/min/mg. After challenging with WSSV there was a decrease but it was not significant compared to the 0th day in both treatments with each of $0.2675^{ab} \pm 0.05173$ U/min/mg and $0.2437^a \pm 0.03027$ U/min/mg. At the end of staining, the PO value in P1 treatment did not differ significantly from day 4, which was $0.2772^{ab} \pm 0.04491$ U/min/mg, but had a difference but was not significant with P2 which was $0.2527^a \pm 0.01472$ U/min/mg.

The survival of pacific white shrimp shows the differences between the two treatments. The survival of pacific shrimp immunized with crude protein *Zoothamnium penaei* and infected with WSSV (P1) has the highest survival rate of 90%. The percentage of survival in P2 treatment that was only infected with WSSV was 10%. The results obtained that the value of virus copy in P2 treatment was 100,000 copies, whereas in the P1 treatment WSSV was not identified on the seventh day. The *sub-acute* will show clinical symptoms in the form of white spots (*white spots*) on the carapace and rostrum. Morphologically, the body, swimming legs, and tail of dying pacific white shrimps will turn reddish (*discoloration*) to brown.